

ニッポンハム食の未来財団 平成 30 年度個人研究助成 研究完了報告書

研究課題名	独自の機能性ペプチドを用いた食物アレルギーに対する根治療法の開発
フリガナ	ヨシオカ ヤスオ
代表者名	吉岡 靖雄
所属機関（機関名） （役職名）	大阪大学 微生物病研究所 特任准教授（常勤）
本助成金による 発表論文，学会発表	該当無し

研究結果要約

食物アレルギーなどのアレルギー疾患は、非自己の抗原に対して免疫機能が異常活性化する免疫疾患であり、未だ、有効な根本的治療法に乏しい現状にある。食物アレルギーでは、食物抗原特異的な IgE 抗体が産生された後、抗原との複合体がマスト細胞を活性化させることでアレルギー症状を呈することから、抗原特異的 IgE の産生を抑制する、もしくは、マスト細胞の活性化を抑制することが、予防・治療に重要と考えられている。そこで本研究では、独自に創成した、樹状細胞に結合する 2 種類の機能性ペプチドを用い、食物抗原に対する免疫応答の改変による治療法開発に関する基礎検討を実施した。まず、卵アレルギーの主要抗原であるニワトリ卵白アルブミン（OVA）由来の抗原ペプチドに機能性ペプチドを付与したうえで、CpG 核酸と共に皮下投与することで、OVA 特異的 IgG2 の産生を伴う Th1 型免疫応答を強力に誘導することに成功した。食物アレルギーモデルマウスにおける有用性を未だ詳細には評価できていないものの、免疫応答の改変によるアレルギー症状の軽減に向けた基盤技術になり得るものと期待される。また、他の抗原を用いた検討から、免疫寛容を誘導し得る可能性が見出されていた機能性ペプチドについて、OVA 由来ペプチドを用いて免疫寛容の誘導を評価した結果、期待される効果を得ることができなかった。本結果については、より詳細な解析の必要があるものと考えられた。

研究目的

食物アレルギーなどのアレルギー疾患は、非自己の抗原に対して免疫機能が異常活性化する免疫疾患であり、未だ、有効な根本的治療法に乏しい現状にある。特に、原因食物を含めて、食事に制限が生じることも多く、乳幼児を含め罹患者の QOL が低下している状況にある。食物アレルギーでは、食物抗原特異的 IgE 抗体が産生され、抗原との複合体がマスト細胞を活性化することで、症状を呈すると考えている。そのため、抗原特異的 IgE の産生を抑制することができれば、食物アレルギーの根治療法になり得るものと考えられている。さらに申請者はこれまで、ダニ抗原を用いた検討ではあるものの、抗原特異的 IgE の産生量に変化が無くとも、抗原特異的 IgG の産生が増加することで、IgE と抗原との結合が阻害された結果、アナフィラキシー症状が顕著に抑制されることを報告しており¹⁾、他の研究者らも、同様の現象を報告している²⁾。以上を鑑みると、食物アレルギーの根治療法に向けては、①Th2 型免疫応答から Th1 型免疫応答に変換することで、抗原特異的 IgE の産生を抑制する、②免疫寛容の誘導により抗原特異的 IgE の産生を抑制する、③抗原特異的 IgG の産生を増強することで、抗原特異的 IgE の機能を減弱させるなどの戦略が考えられる。

T 細胞や B 細胞などの様々な免疫細胞により維持される免疫系において、樹状細胞は司令塔の役割を担っている。樹状細胞は異物である抗原を取込んだ後、免疫を活性化もしくは抑制すべきかの情報を T・B 細胞に伝達する。そのため、抗原特異的な免疫応答を活性化もしくは抑制するためには、目的抗原を樹状細胞に効率的に送達することが必要不可欠となる。しかし現状では、抗原蛋白質・ペプチドを単独で投与しても、免疫応答の場であるリンパ節への移行性に乏しく、樹状細胞にも殆ど取込まれないため、免疫応答を効率的に活性化もしくは抑制しにくい状況にある。

本観点ではこれまで、樹状細胞選択的な抗原送達を目指し、リポソームやナノキャリアによる受動送達が試みられてきたものの、作製が煩雑なばかりか、貪食活性を有するマクロファージにも送達され、樹状細胞特異性は極めて低いなど、樹状細胞特異的に抗原を送達可能な方法論は皆無である。一方で申請者はこれまで、7 アミノ酸からなる 10 億種類のランダムペプチドを表面提示したフェージライブラリを用いることで、樹状細胞選択的に結合可能な機能性ペプチドを複数同定しており、上記①②③の達成に向けた基盤素材を有していた。

研究計画及び研究手法

本研究では、独自に創成してきた 2 種類の機能性ペプチドを用い、食物アレルギーの根治療法に向けた有用性を評価した。

免疫改変ペプチド：1 種類のペプチドについてこれまで、1) 樹状細胞に結合可能であること、2) 樹状細胞表面上の蛋白質 X に結合し得ること、3) 細菌由来抗原との融合蛋白質を作製したうえで、マ

ウスに投与したところ、野生型抗原投与群と比較して、免疫活性化剤（アジュバント）を加えなくとも顕著に抗原特異的抗体を産生誘導することを見出している。そこで本研究では、本ペプチドを用いて、Th1 型免疫の増強および食物抗原特異的 IgG を効率的に誘導することで、食物アレルギーの症状を軽減可能か検証した。

- ✓ 融合蛋白質の作製：まず、卵アレルギーの主要抗原として知られるニワトリ卵白アルブミン（OVA）と本ペプチドの融合蛋白質の作成を試みた。融合蛋白質をコードするプラスミドを大腸菌 BL21 株に導入し、IPTG で発現誘導したうえで、His タグカラム等を用いて蛋白質精製を試みた。
- ✓ 次ページに理由を記載するが、上述の組換え OVA 蛋白質ではなく、OVA の 323 番目から 339 番目をコードするアミノ酸からなる OVA ペプチドも抗原として使用した。本 OVA ペプチドは MHC クラス II に提示されることで CD4 陽性 T 細胞を活性化すると共に、抗体エпитープにもなり得ることが知られている。事実、食物アレルギーにおいて、本 OVA ペプチドを認識する抗体が多数誘導されていることが報告されている。免疫改変ペプチドと OVA ペプチドの融合ペプチドを化学合成したうえで、マウスに皮下投与した。その際、アジュバントとして、Th1 型免疫応答を誘導可能な CpG 核酸（TLR9 リガンド）を使用した。
- ✓ 免疫したマウスから血漿を回収し、OVA ペプチドもしくは OVA に対する抗体価（総 IgG、IgG1、IgG2c）を ELISA により評価した。また、免疫したマウスから脾臓を回収した後、脾細胞を OVA 存在下で数日間培養し、培養上清中のサイトカイン量を ELISA で評価した。
- ✓ マウス骨髄由来樹状細胞に融合ペプチドを添加し、MHC クラス II への抗原提示能をフローサイトメトリーにより評価した。本検討では、MHC クラス II エピトープである E α ペプチドを用いた。

免疫抑制ペプチド：他の 1 種類のペプチドについてこれまで、1) 樹状細胞に結合可能であること、2) 樹状細胞表面上の蛋白質 Y（上記の蛋白質 X とは異なる）に結合し得ること、3) モデル抗原との融合蛋白質を作製したうえで、マウスに投与したところ、抗原特異的免疫寛容が誘導されることを見出している。そこで本研究では、本ペプチドを用いて、食物抗原特異的な免疫寛容を誘導可能か検証した。

- ✓ 上記の免疫改変ペプチドと同様に、OVA ペプチドとの融合ペプチドを実験に供した。
- ✓ 融合ペプチドをマウスに皮下投与した。その後、アジュバントと共に OVA 蛋白質を投与することで、OVA に対する免疫応答を誘導した。マウスから脾臓を回収した後、脾細胞を OVA 存在下で数日間培養し、培養上清中のサイトカイン量を ELISA で評価した。

結果と考察

免疫改変ペプチド

まず、卵アレルギーの主要抗原である OVA を用いて、免疫改変ペプチドとの融合蛋白質の作成を図った。組換え OVA についてはこれまで、大腸菌で発現させた場合、不溶性となり作製が困難であることが知られていた。我々の検討においても、不溶性画分に大部分が移行することが観察されたものの、蛋白質発現を最適化（温度、IPTG 濃度の検討など）することで、可溶性の OVA を得ることができた。一方で、作製した組換え OVA をマウスに免疫したところ、市販の精製 OVA を免疫した場合と比較して、OVA 特異的抗体産生が顕著に低いことが判明した。そのため、OVA 蛋白質とペプチドの融合 OVA を作製したものの、本融合蛋白質を用いた検討を断念した。そこで、前ページに記載した OVA ペプチドと免疫改変ペプチドとの融合ペプチド（以下、融合 OVA ペプチドと略す）を化学合成し実験に供した。OVA ペプチドもしくは融合 OVA ペプチドをマウスに 2 回皮下投与した後、血中の OVA もしくは OVA ペプチド特異的抗体価を ELISA により評価した。その結果、OVA ペプチドは、アジュバントである CpG 核酸と共に投与した場合においても、全く抗体産生を誘導することができなかった。一方で、融合 OVA ペプチドについては、アジュバントを用いなくとも、OVA ペプチドもしくは OVA 特異的 IgG を強く産生することが判明した。抗原特異的 IgG は、Th1 型の指標である IgG2、Th2 型の指標である IgG1 に大別されるが、融合 OVA ペプチドの投与では IgG1 が産生されていた。さらに、融合 OVA ペプチドと CpG 核酸を共投与した場合、融合 OVA ペプチドの単独投与群と比較して、OVA ペプチドもしくは OVA 特異的 IgG の産生が顕著に増加すると共に、抗体のアイソタイプの大半は IgG2 であった。また、ペプチドを投与後、脾細胞を回収し、*in vitro* において OVA で再刺激した後、上清中のサイトカイン産生を ELISA で評価した。その結果、OVA ペプチド投与群ではアジュバントの有無に関わらず全く産生が観察されない一方で、融合 OVA ペプチドと CpG 核酸の共投与群においては、Th1 型の指標である IFN- γ の産生が顕著に誘導されていた。以上の結果から、融合 OVA ペプチドはアジュバントを加えなくとも強力な免疫応答を誘導可能であること、さらに、CpG 核酸と共投与することで、Th1 型免疫応答を強力に誘導可能であることが示された。また、免疫改変ペプチドの免疫増強メカニズムの一環として、融合 OVA ペプチドの抗原提示能を *in vitro* で評価した。マウス骨髄より分化誘導した樹状細胞に、E α ペプチドと免疫改変ペプチドの融合ペプチドを添加した後、E α ペプチドの MHC クラス II への提示をフローサイトメトリーにより評価した。その結果、E α ペプチド単独添加群と比較して、融合ペプチド添加群において、抗原提示効率が顕著に増加していた。以上の結果から、免疫改変ペプチドは、樹状細胞に結合した後、抗原提示を効率的に誘導することで、免疫応答を増強することが示唆された。

上記検討は、C57BL/6 マウスを用いた検討結果である一方で、OVA の食物アレルギーモデルは BALB/c マウスを用いて実施するのが一般的である。そこで、BALB/c マウスにおいても、同様の検討を実施した。その結果、C57BL/6 マウスと同様に、OVA ペプチドにおいては CpG 核酸と共投与

しても全く抗体産生が誘導されない一方で、融合 OVA ペプチドはアジュバントを加えなくとも、OVA ペプチドもしくは OVA 特異的 IgG を強く産生すること、また、CpG 核酸と共投与することで、IgG2 の産生および IFN- γ の産生を伴う Th1 型免疫応答が誘導されることが判明した。以上の結果から、食物アレルギーを発症する前、もしくは発症初期の段階で、本融合ペプチドを CpG 核酸と共投与することで、食物アレルギーの発症原因となる Th2 型免疫応答を Th1 型免疫応答に変換し、抗原特異的 IgE の産生を抑制することが可能になるのではないかと考えられた。また、抗原特異的 IgG が強く誘導されることで、IgE の抗原への結合を阻害し、アナフィラキシー応答を抑制できるものと期待された。

そこで、OVA を用いた食物アレルギーモデルにおける本融合ペプチドの有用性評価を試みた。OVA をアジュバントと共に腹腔内投与した後、経口的に OVA を経口投与する食物アレルギーモデルを用いた。本検討では、食物アレルギーを発症した後の治療を想定し、OVA をアジュバントと共に腹腔内投与した後、融合 OVA ペプチドと CpG 核酸を共投与し、その後、OVA を経口投与した。食物アレルギーの発症は下痢を指標に評価した。しかし残念ながら、本実験プロトコールでは、融合 OVA ペプチドと CpG 核酸の共投与により、食物アレルギーの発症を予防するには至らなかった。組換え OVA の作製に時間を要したこと、また、OVA ペプチドの使用に方向転換したことも相俟って、研究期間の都合上、本検討は 1 回しか実施できていない。そのため、再度、同様のプロトコールで有用性を評価すると共に、予防的プロトコール（融合 OVA ペプチドと CpG 核酸を共投与した後、OVA 蛋白質をアジュバントと腹腔内投与する）での検討をも実施するのが望ましいと考えられた。以上、免疫改変ペプチドについては、モデルマウスを用いた治療・予防効果の検証以外は、想定通りの成果を得ることができたと考えている。モデルマウスを用いた検討については、十分な解析ができなかったのが非常に残念であり、現在も継続して検討中である。今年度中には、モデルマウスでの検討結果をも含め、論文・学会発表したいと念じている。

免疫抑制ペプチド

申請者はこれまで、本ペプチドが抗原特異的免疫寛容を誘導し得る可能性を見出している。そこでまず、本結果の再現性実験を実施した。ビオチン化された本ペプチドとストレプトアビジンを混合することで複合体を作製し、マウスに 1 回もしくは 2 回皮下投与した。その後、ペプチドで修飾していないストレプトアビジンをアジュバントと共に皮下投与し、ストレプトアビジンに対する抗体産生を評価した。その結果、本ペプチドとストレプトアビジンの複合体を事前に投与していた群において、ストレプトアビジンとアジュバントの共投与による抗体産生が顕著に抑制されることが確認できた。事前に、ストレプトアビジン単独もしくは他のビオチン化ペプチドとの複合体を投与していた群においては、事前処理をしない群と同等もしくはそれ以上にストレプトアビジンに対す

る抗体産生が増強することも示された。以上の検討から、本ペプチドと抗原との複合体を事前に投与することで、その後、抗原特異的免疫応答を誘導しても抑制されることが、再現性を含め確認された。そこで、本知見の食物アレルギーモデルへの適用を試みた。

本ペプチドにおいても、当初、組換え OVA 蛋白質との融合蛋白質の作製を試みたが、上述した理由により、OVA ペプチドとの融合ペプチドを化学合成した。まず、本融合ペプチドをマウスに皮下投与し、OVA に対する抗体価を測定した。その結果、OVA ペプチドと同様に、OVA に対する抗体産生を誘導することはなかった。そこで、OVA ペプチドもしくは融合ペプチドをマウスに1回もしくは2回皮下投与した後、OVA をアジュバントと共に皮下投与した。その後、OVA に対する抗体産生を評価した。その結果、ストレプトアビジンにおける結果とは異なり、事前に融合 OVA ペプチドを投与していても、抗体産生を抑制することはできなかった。また T 細胞応答についても同様に、融合 OVA ペプチドの事前投与による抑制作用は確認できなかった。以上の検討から、OVA ペプチドを用いた検討においては、本免疫抑制ペプチドにより免疫寛容を誘導することはできないものと考えられた。モデル抗原における結果との違いを考慮して、今後は、OVA 蛋白質に化学的に本ペプチドを付与するなどの検討を実施する必要があると考えられた。本検討においては、時間の都合上、未だ実施することはできていないが、現在、検討の準備を進めているところである。

今後の研究活動について

現在、食物アレルギーをはじめとしたアレルギー疾患に対する免疫療法の開発を目指して、抗原蛋白質とアジュバントを投与することで、Th2 型免疫応答を Th1 型免疫に変換しようとする試みがなされている。しかし、抗原蛋白質を投与することで、アナフィラキシーを誘発する懸念もあり、抗原因由来ペプチドを用いる試みにも期待が寄せられている。しかし、抗原因由来ペプチドを用いた場合、アジュバントを添加したとしても十分な免疫応答を誘導できないというジレンマが存在する。即ち、抗原蛋白質および抗原ペプチドのいずれを用いた場合においても、より効率的に Th1 型免疫を誘導し得る方法論の確立が、アレルギー疾患の克服に向けては重要と考えられる。本観点で、免疫改変ペプチドについては、予定通り研究が進捗し、80%程度予想通りの結果が得られたものと考えられるが、食物アレルギーモデルでの有用性を確認できなかった点が課題として残っている。一方で、アジュバントの量を増やすことなく、Th1 型の免疫応答をこれほどまでに増強可能な戦略は、食物アレルギーに対する治療戦略として有用と期待される。

免疫抑制ペプチドについては、残念ながら、予想通りの結果が得られたとは言い難い。モデル抗原で得られていた免疫抑制作用が、OVA ペプチドで得られなかった原因を探求したが、未だ原因はつかめていない。今後、より詳細に検討することで、免疫寛容を誘導可能な方法論についても、開発していきたいと念じている。

参考文献

- 1) Hirai T, Yoshioka Y, Takahashi H, Handa T, Izumi N, Mori T, Uemura E, Nishijima N, Sagami K, Yamaguchi M, Eto S, Nagano K, Kamada H, Tsunoda S, Ishii KJ, Higashisaka K, Tsutsumi Y. High-dose cutaneous exposure to mite allergen induces IgG-mediated protection against anaphylaxis. *Clin Exp Allergy*. 2016 Jul;46(7):992-1003.
- 2) Wachholz, PA, Durham, SR. Mechanisms of immunotherapy: IgG revisited. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2004 Aug;4(4):313-8.

以上